

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

10-6-00

(51)

Int. CL 2:

G 01 N 33-16

(52) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

G 01 N 21-24



1
16
2
DT 24 09 273 A1

(11)

Offenlegungsschrift 24 09 273

(21)

Aktenzeichen: P 24 09 273.7-52

(22)

Anmeldetag: 27. 2. 74

(44)

Offenlegungstag: 4. 9. 75

(30)

Unionspriorität:

(22) (33) (31)

(54)

Bezeichnung:

Verfahren und Vorrichtung zum Messen von
Antigen-Antikörper-Reaktionen

(71)

Anmelder:

Behringwerke AG, 3550 Marburg

(72)

Erfinder:

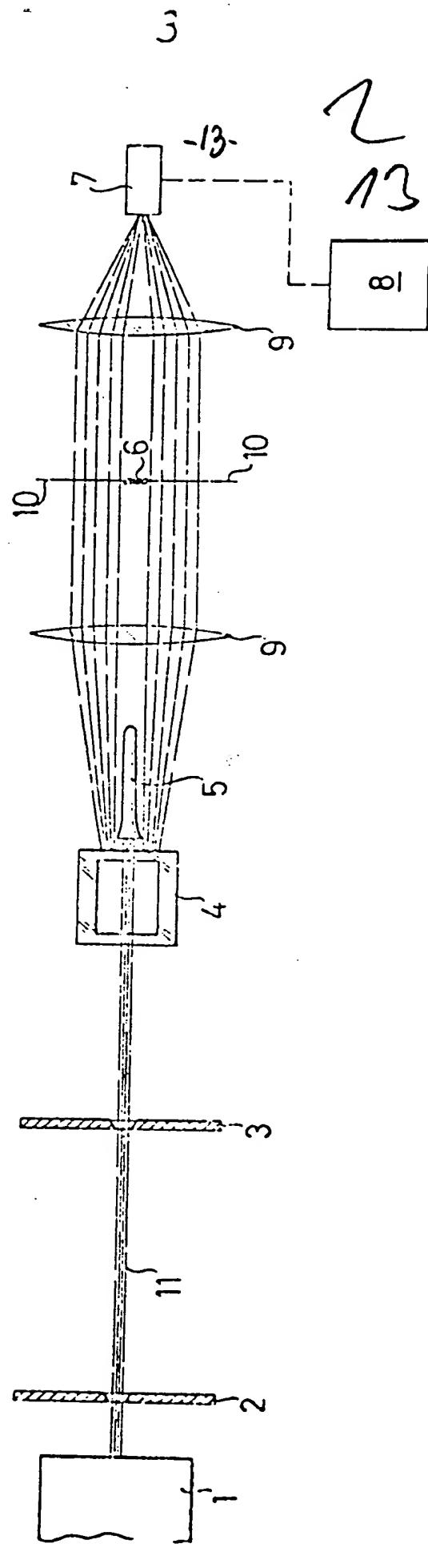
Gross, Jürgen, Dipl.-Phys. Dr., 6238 Hofheim;
Holst, Arno, Dipl.-Chem. Dr.; Lask, Helmut; 6200 Wiesbaden;
Sieber, Axel, Dipl.chem. Dr., 3550 Marburg

Prüfungsantrag gem. § 28b PatG ist gestellt

ZEHNWERKE AG.
Morsburg/Lahn

Anlage zur Patentanmeldung NGE 74/2004 und Hf. Mg. 138 vom 21.2.1974
"Verfahren und Vorrichtung zum Messen von Antigen-Antikörper-
Reaktionen"

FIG. 1



2409273

COIN 33-16 AT:27.02.1974 OT:04.09.1975

2409273

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Messen von Antigen-Antikörper-Reaktionen, bei dem die Lösung des zu bestimmenden Antigens mit dem korrespondierenden Antikörper vermischt, die Mischung in den Strahlengang einer Lichtquelle gestellt und das nach vorwärts gestreute Licht mit einem Photodetektor gemessen wird, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung mit Laserlicht durchstrahlt und ausschließlich das unter kleinem Raumwinkel nach vorwärts gestreute Licht mit dem Photodetektor mißt und anschließend quantitativ analysiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das durch die Mischung hindurchgehende nicht gestreute Laserlicht vernichtet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das durch die Mischung hindurchgehende nicht gestreute Laserlicht in die Lichtquelle reflektiert wird.
4. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Meßküvette in der optischen Achse eines Meßsystems, bestehend aus einem Laser, mindestens zwei Blenden, einem Linsensystem und einem Photodetektor, zwischen den Blenden und dem Linsensystem angeordnet ist, und daß das Meßsystem zwischen Meßküvette und Linsensystem in der optischen Achse eine Lichtfalle aufweist, deren Durchmesser das 1,1- bis 1,7fache des Laserstrahldurchmessers beträgt.

3

4

Leer¹⁰seite

Wie aus dieser Aufstellung zu ersehen, ist die Diffusionsmethode für eine Anzahl von Antigenen in Körperflüssigkeiten oder Kulturfiltraten von Mikroorganismen häufig nicht empfindlich genug. Wegen der erforderlichen Diffusionszeit sind diese Methoden zudem langwierig. Während die empfindlicheren Testsysteme wie die Haemagglutination relativ aufwendig sind, sind die radioimmologischen Verfahren durch den hohen Preis der Reagenzien und der erforderlichen Meßgeräte sehr kostspielig.

Einen Fortschritt in der Steigerung der Empfindlichkeit der schnell ablaufenden und mit bloßem Auge ablesbaren Flockungsreaktionen brachte der Einsatz von optischen Trübungsmeßgeräten, sogenannten Nephelometern.

Nephelometrische Konzentrationsbestimmungen sind spezifisch, schnell und preisgünstig. Hierbei wird das Streulicht, das von Präzipitatteilchen einer trüben Lösung ausgeht, gemessen. Es wird zunächst die Streulichtintensität von Lösungen unterschiedlicher, aber bekannter Konzentrationen gemessen und eine Eichkurve aufgestellt. Unter gleichen Versuchsbedingungen erfolgt dann die Streulichtmessung der unbekannten Lösung.

Die verwendeten Meßgeräte bestehen aus einer inkohärenten Lichtquelle, einer optischen Spaltsystemanordnung, einer Küvette und einem Photodetektor. Nachteilig bei diesen Geräten ist die den Anforderungen häufig nicht genügende Nachweisempfindlichkeit, sowie die mangelnde Reproduzierbarkeit an der unteren Nachweissgrenze.

Diese Analysengeräte sind zudem sehr kostspielig. Automatische Geräte werden vereinzelt in Großkliniken eingesetzt, wo große Probenmengen analysiert werden. Beim Wechsel zur Bestimmung eines anderen Antigens muß die Anlage in mehreren Spülgängen gereinigt werden. Es werden daher für Mehrfachbestimmungen teure, parallel laufende Analysenstraßen verwendet.

In kleineren Kliniken, in der Arztpraxis oder in wissenschaftlichen Laboratorien benötigt man in der Bedienung flexibel re

2409273

und preislich günstigere Geräte.

Es stellt sich daher die Aufgabe, eine Vorrichtung zu finden, mit der die Nachweisempfindlichkeit und deren Reproduzierbarkeit erheblich verbessert wird und die flexibler anwendbar ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Messen von Antigen-Antikörper-Reaktionen, bei dem die Lösung des zu bestimmenden Antigens mit dem korrespondierenden Antikörper vermischt, die Mischung in den Strahlengang einer Lichtquelle gestellt und das nach vorwärts gestreute Licht mit einem Photodetektor gemessen wird, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung mit Laserlicht durchstrahlt und ausschließlich das unter kleinem Raumwinkel nach vorwärts gestreute Licht mit dem Photodetektor mißt und anschließend quantitativ analysiert.

Darüber hinaus wurde eine Vorrichtung zur Durchführung des oben bezeichneten Verfahrens gefunden, die dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Meßküvette in der optischen Achse eines Meßsystems, bestehend aus einem Laser, mindestens zwei Blenden, einem Linsensystem und einem Photodetektor, zwischen den Blenden und dem Linsensystem angeordnet ist und, daß das Meßsystem zwischen Meßküvette und Linsensystem in der optischen Achse eine Lichtfalle aufweist, deren Durchmesser das 1,1- bis 1,7fache des Laserstrahldurchmessers beträgt.

Unter Lichtfalle werden z.B. Einrichtungen zum Absorbieren des Lichtes oder Umlenken des Lichtes wie Spiegel, Prismen, Lichtleiter u.dgl. verstanden.

Die Vorrichtung kann dadurch verbessert werden, daß man innerhalb des Linsensystems eine Einrichtung zum Ausblenden des von den Blenden herrührenden Streulichts anordnet.

Besteht die Lichtfalle aus einem Spiegel, so kann bei entsprechender Justierung zu den Laserendflächen oder zu einem zwischen Laser und Meßküvette angeordneten Spiegel eine Intensitätsverbesserung erreicht werden.

509836/0830

2409273

Die Figuren zeigen die Erfindung in beispielsweiser Ausführung.
Fig. 1 zeigt einen schematischen Aufbau der Vorrichtung mit
der Anordnung des Strahlenganges.

Die Fig. 2 und 3 zeigen zwei Ausführungsbeispiele. Aufgetragen
ist das Streulichtsignal U als Funktion der Konzentration C.

In das Lichtbündel 11, eines Lasers 1, beispielsweise eines He-Ne-Lasers, werden die beiden Blenden 2 und 3 gebracht. Hinter den Blenden durchdringt das Laserlicht eine beispielsweise 10 mm tiefe, 4 mm breite und 20 mm hohe Küvette 4. Ein einseitig verschlossenes geschwärztes Röhrchen 5 (Durchmesser 1,5 mm) o.ä. dient als Lichtfalle für den direkten Laserstrahl und ist vorzugsweise direkt hinter der Küvette angeordnet. In die Küvette werden 0,1 ml des Antigens, beispielsweise menschliches Serum, und 0,1 ml Antiserum, das Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen enthält, gefüllt. Die in der Reaktionslösung entstehenden Präzipitatteilchen streuen Licht. Das unter kleinem Raumwinkel in Vorwärtsrichtung gestreute Licht wird mit Hilfe eines Linsensystems 9 auf einen Photodetektor 7 gesammelt. Bei Verwendung der oben beschriebenen Küvette gelangt auch unter größeren Winkeln gestreutes Licht durch Reflexion an den Innenwänden der Küvette noch in das Linsensystem. Die Signale des Photodetektors 7, z.B. einer Photodiode, werden einem Nachweisinstrument 8, z.B. einem Schreiber, zugeführt. Eine kleine schwarze Blende 6 (Durchmesser ist ca. Laserstrahldurchmesser) wird innerhalb des Linsensystems 9 an vier dünnen Fäden 10 befestigt. Hierdurch kann das an den Blenden 2 und 3 entstehende Streulicht ausgeblendet und der Störuntergrund verkleinert werden.

Im Versuch zum Nachweis der Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens wurde als Antigen-Antikörper-Reaktion das System Albumin/Antialbumin eingesetzt. Dazu wurde als Antigen

2409273

ein albuminhaltiges menschliches Blutserum 1:52 verdünnt. Als Antikörper wurde ein Anti-Humanalbumin-Serum vom Kaninchen in zwei Verdünnungen (1:5 bzw. 1:40) eingesetzt. Die Reagenzlösungen wurden durch ein Membranfilter, vom Porendurchmesser vor teilhaft kleiner als 0,3 μm , filtriert und gleiche Volumina in die Küvette gefüllt. Nach 45 Minuten wurde die Küvette kräftig geschüttelt, um den selbst noch bei niedrigen Konzentrationen, d.h. $< 10^{-2} \text{ mg}/100 \text{ ml}$, auftretenden Bodensatz aufzuwirbeln. Die Küvette wurde in den Strahl des Lasers gebracht und das Streulicht gemessen. Bei höher wie auch bei niedriger Antikörperkonzentration wurde ein linearer Zusammenhang in doppellogarithmischer Darstellung über 4 Zehnerpotenzen der Albuminkonzentration festgestellt.

Fig. 2 zeigt Antigen-Antikörper-Reaktionskennlinien A, B und C von drei verschiedenen gegen das Antigen Albumin gerichteten Kaninchen-Antiseren. Die Streulichtintensität U ist über 4 Zehnerpotenzen hinweg in doppellogarithmischer Darstellung linear von der Albuminkonzentration abhängig.

Die Abweichungen der Meßpunkte von der zeichnerisch gemittelten Funktion betrugen oberhalb 0,1 mg/100 ml nur etwa $\pm 5\%$. Bei relativ hohen Konzentrationen von Standard-Human-Serum von 10 mg/100 ml lösten sich die Präzipitatteilchen teilweise wieder auf und das Streulichtsignal nahm ab. In diesen Fällen empfiehlt sich eine entsprechende Vorverdünnung der Antigenlösung.

Bei herkömmlichen Streulichtmessungen erreicht man Genauigkeiten von $\pm 10\%$, wobei die untere Nachweisgrenze im günstigsten Falle bei etwa $10^{-1} \text{ mg}/100 \text{ ml}$ liegt. Durch den Einsatz eines Gaslasers, wie eines He-Ne-Lasers von 1 mW und durch Messen des in Vor wärtsrichtung gestreuten Lichtes kann bei nephelometrischen Untersuchungen eine Empfindlichkeitssteigerung um einen Faktor von etwa 100 erreicht werden. Der quantitative Nachweis von Antigenkonzentrationen von $10^{-3} \text{ mg}/100 \text{ ml} \hat{=} 0,01 \mu\text{g}/\text{ml}$ wird beim Einsatz von sorgfältig filtrierten Lösungen möglich. Die Reproduzierbarkeit der Meßpunkte der Eichkurve ist sehr gut.

Die einmal festzustellende Abhängigkeit der Antigenkonzentrationen von der entsprechenden Signalintensität des Laserstreulichts erlaubt wiederholt die Zuordnung des gemessenen Signals zur gesuchten Konzentration des Antigens. Dadurch erscheint es nicht erforderlich, bisher übliche Kontroll- und Parallelmessungen mit Eichsubstanzen durchzuführen.

Es wurde weiter gefunden, daß durch Erhöhung der Leistung der Lichtquelle um das Dreifache, beispielsweise durch Ersatz eines 1 mW-Lasers durch einen 3 mW-Laser, und durch eine verbesserte Fokussierung des Streulichts auf den photoelektrischen Empfänger, z.B. durch Verwendung einer Mikroskoplinse als Linsensystem 9, die Empfindlichkeit des Gerätes wesentlich gesteigert werden kann. Mit diesem empfindlicheren Gerät gelang es, um eine weitere Zehnerpotenz bis in den 0,001 µg/ml-Meßbereich vorzustoßen und Spurenantigene nachzuweisen. Für quantitative Untersuchungen in diesem Bereich ist es jedoch erforderlich, Vorkehrungen gegen Staubverunreinigungen im Meßraum durch Laminarflow zu treffen.

Bekanntlich läßt sich durch Zugabe von Äthylenglykol die Zeit der Antigen-Antikörper-Reaktion verkürzen, die auch bei den Laserstreuichtmessungen genutzt werden kann.

Es ist weiter bekannt, daß bei hohen Antigen-Konzentrationen ein Teil der Präzipitatteilchen noch innerhalb der Reaktionszeit sedimentiert. Der Reaktionsansatz wird daher vorteilhaft nach Beendigung der Reaktion kräftig geschüttelt. Diese Meßwerte sind häufig besser zu reproduzieren als Werte von Reaktionsansätzen, die nicht geschüttelt wurden.

Erfindungsgemäß lassen sich alle Antigene in Lösungen bestimmen, gegen die spezifisch Antiseren erhalten werden können. Ein bevorzugtes Anwendungsgebiet der Methode liegt in der quantitativen Bestimmung der Bestandteile von Körperflüssigkeiten, insbesondere des Blutplasmas, und von antigenen mikrobiellen Stoffwechselprodukten oder Pflanzeninhaltsstoffen.

AN

2409273

Durch geeignete Abwandlungen der Anordnung, wie sie vorstehend beschrieben wurde, läßt sich das Verfahren auch automatisieren, wie dies in ähnlicher Weise bei Nephelometern mittels Fluoreszenz-Spektral-Photometern bereits bekannt ist.

An einem nachfolgenden Beispiel soll die quantitative Bestimmung eines Spurenproteins aus Plasma die Erfindung näher erläutern.

12

2409273

BEISPIEL

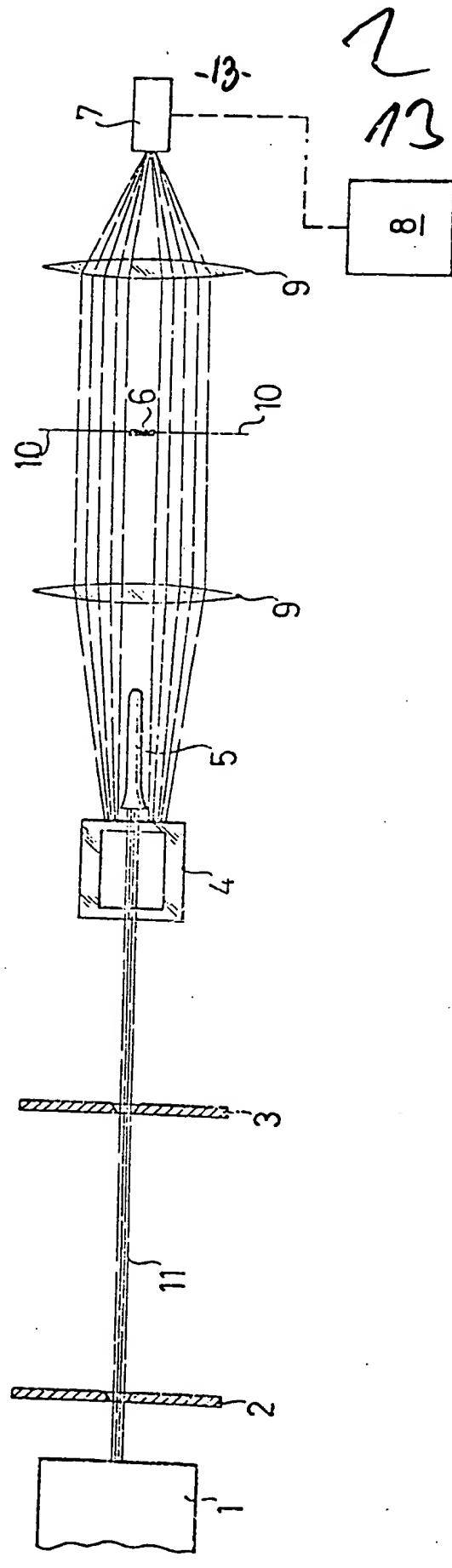
2 ml eines Patientenserums werden durch ein Membranfilter der Firma Millipore (Porendurchmesser 0,05 um) filtriert. 0,2 ml eines IgE-Antiserums, das 1:5 mit isotonischer Kochsalzlösung vorverdünnt wurde, werden in die Meßküvette der Apparatur gegeben und mit 0,2 ml des filtrierten Patientenserums vermischt. Die Küvette wird luftdicht verschlossen und bei Zimmertemperatur 16 Stunden stehengelassen. Danach wird die Küvette dreimal kurz geschüttelt. Nach 10 Minuten in Ruhe wird die Küvette in den Strahlengang des Laser-Streulicht-Meßgerätes gestellt. Fig. 3 zeigt die Kennlinie des Immunglobulin E(IgE)-Spurenproteins, die durch Verdünnung des bei der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Verfügung stehenden Standards gewonnen wurde. Das abgelesene Signal U in mV wird mit den Werten dieser Kennlinie in Beziehung gesetzt. Es ergeben sich 300 Einheiten IgE/ml im getesteten Serum.

Mit der Vorrichtung ist es erstmals möglich, schnell, einfach und sehr empfindlich den IgE-Proteingehalt im Serum bis zu 150 E/ml zu bestimmen. Mit der radialen Immunodiffusion war es bisher nur möglich, erhöhte IgE-Konzentrationen oberhalb 800 E/ml zu messen.

ZEHNWERKE AG
Kardburg / Lahn

Anliege zur Patentanmeldung HQE 74/2004 und H/Ma. 188 vom 21.2.1974
"Verfahren und Vorrichtung zum Messen von Antigen-Antikörper-Reaktionen"

FIG. 1



509836/0830

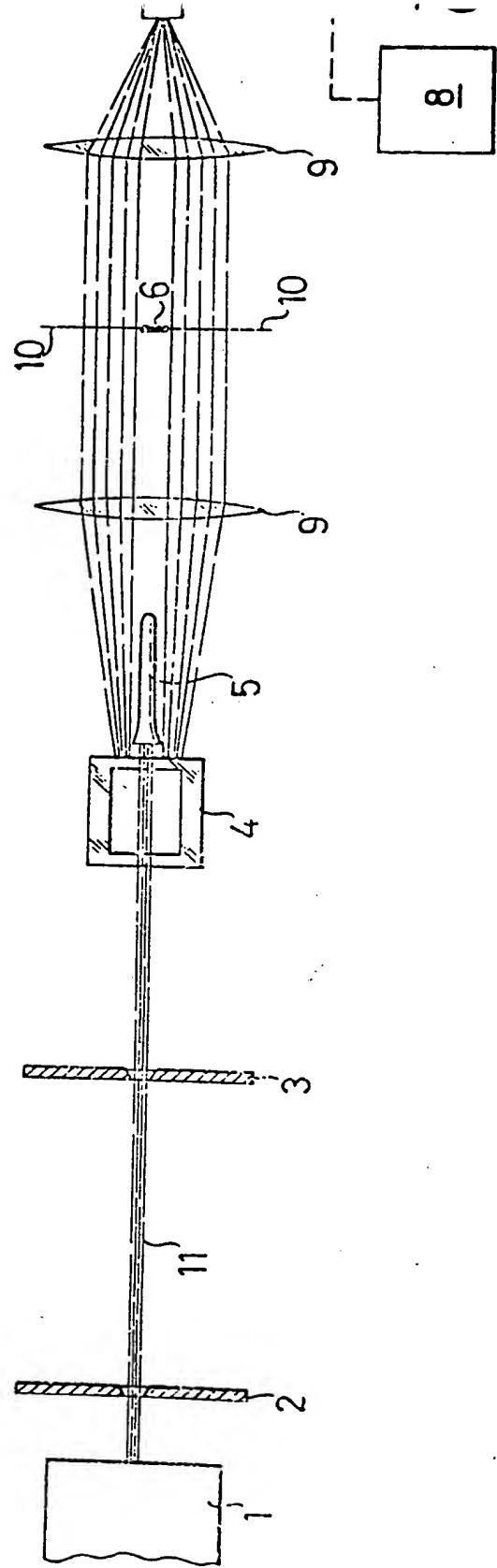
2409273

G01N 73.16 AT:27.02.1974 OT:04.09.1975

ZEPHINSWERKE AG.
Marburg/Lahn

Anlage zur Patentanmeldung HOE 74/2304 und H 1 Ma. ißg vom 21.2.
"Verfahren und Verrichtung zum Messen von Antigen-Antikörper
Reaktionen"

FIG. i



509836/0830

1650

G01N 33-16 AT:27.02.1974 OT:04.09.1975

FIG. i

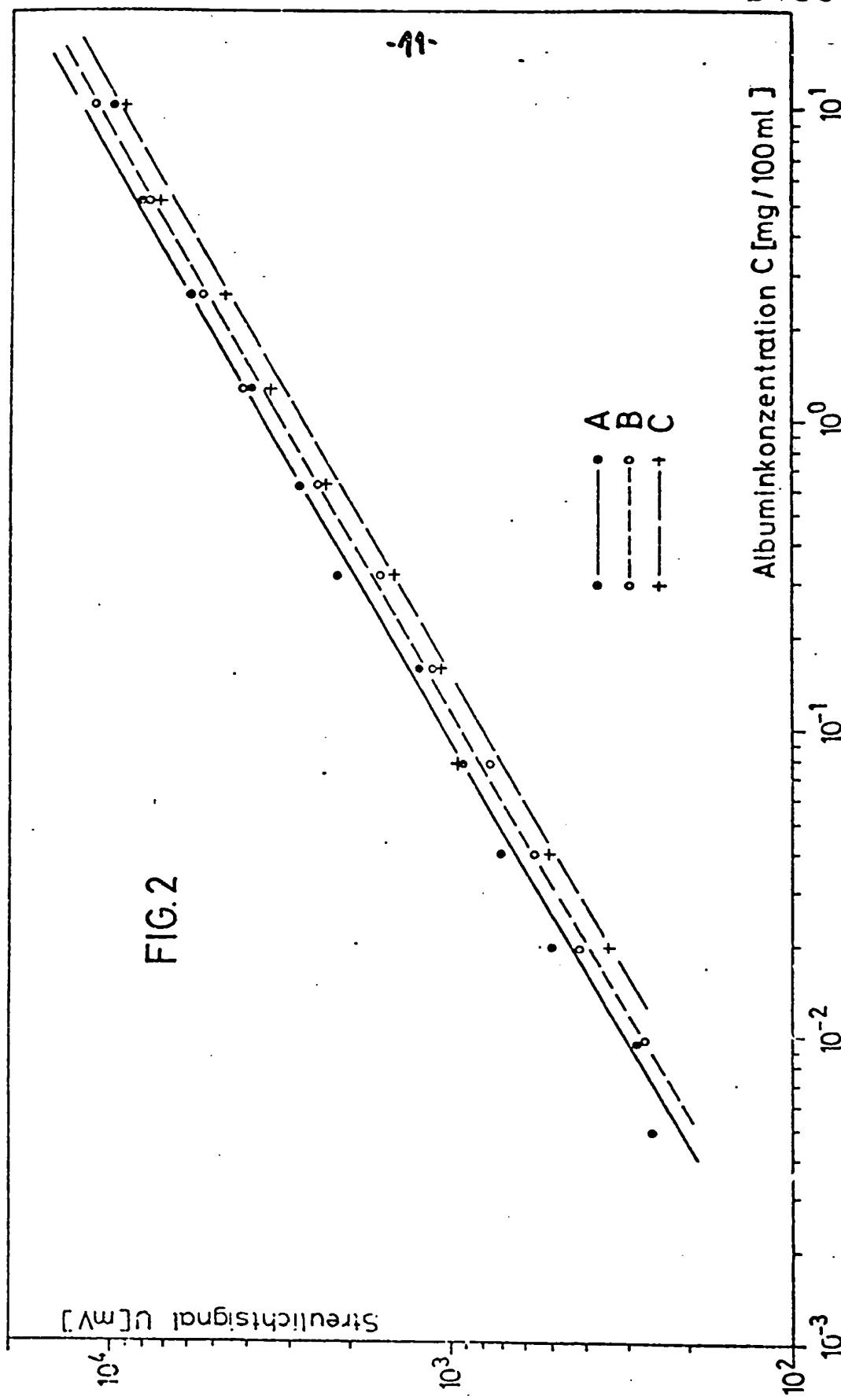
BEHRINGERWERKE AG.
Marburg/Lahn

Anlage zur Patientanmeldung HOE 74/B 004 und H/Ma. 188 vom 21.2.1976.
Verfahren und Vorrichtung zum Messen von Antigen-Antikörper-Reaktionen

14

2409273

FIG. 2



509836/0830

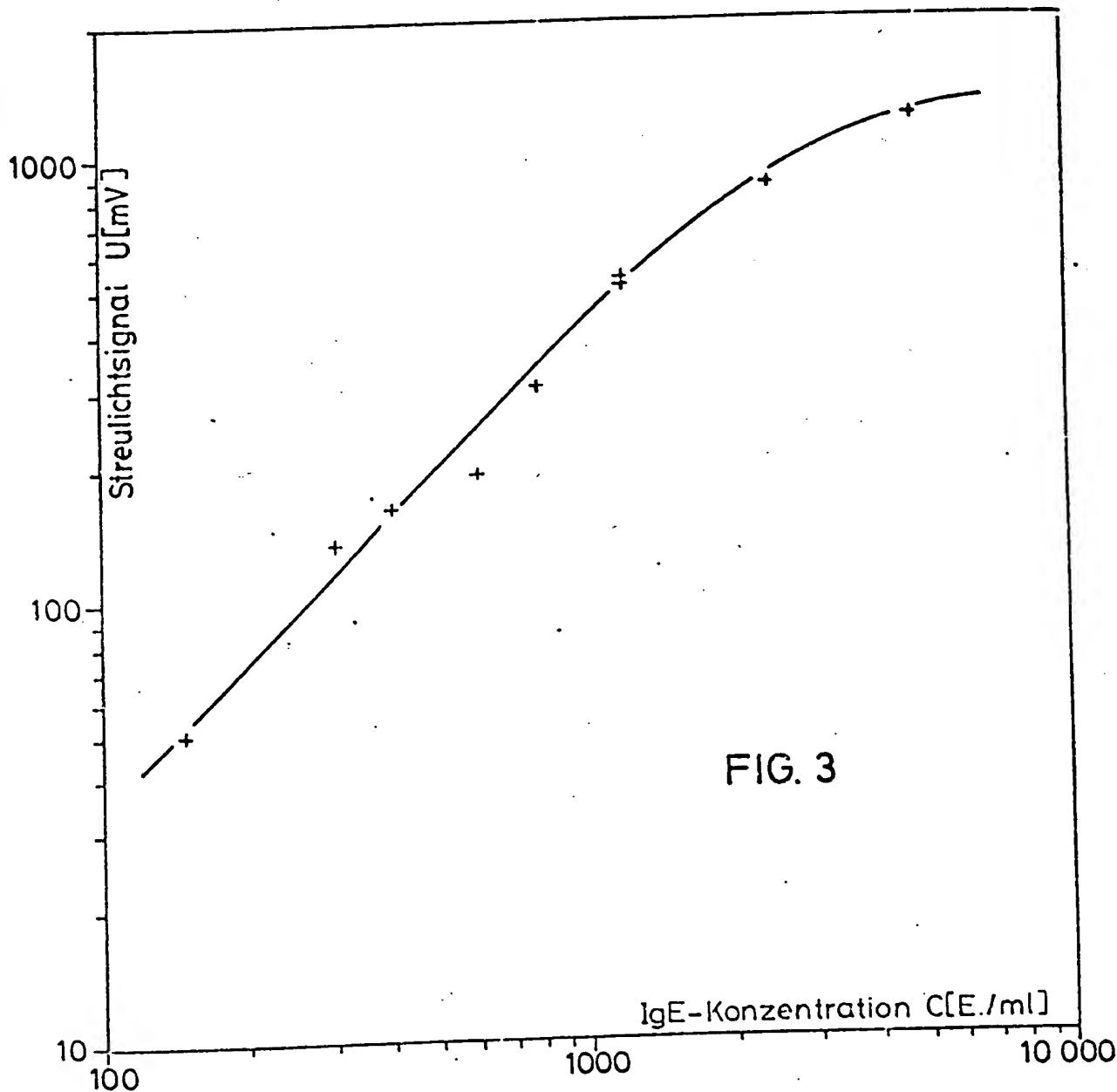
13. BEHRINGWERKE - AG.
Marburg / Lahn

15

2409273

-12-

Anlage zur Patentanmeldung HOE 74/B 004 und H/Ma 138 vom 21.2.1977
"Verfahren und Vorrichtung zum Messen von Antigen-Antikörper-
Reaktionen"



509836/0830